



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Selective autophagy in host defense against mycobacterial infection

Zhang, R.

Citation

Zhang, R. (2018, November 8). *Selective autophagy in host defense against mycobacterial infection*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/66789>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/66789>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/66789> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Zhang, R.

Title: Selective autophagy in host defense against mycobacterial infection

Issue Date: 2018-11-08

Nederlandse samenvatting

Een effectieve behandeling van tuberculose (tbc) blijft een grote uitdaging. Een toename van antibioticumresistente stammen van *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) en co-infecties met hiv dragen sterk bij aan dit probleem. Het is daarom van essentieel belang om effectieve behandelstrategieën te ontwikkelen voor tbc. Een knelpunt bij de behandeling van tbc is dat de bacteriën gedurende lange tijd in compacte conglomeraten van immuuncellen verblijven, zogenaamde granulomen. De traditionele antibiotica kunnen slechts met moeite doordringen in deze granulomen, waardoor langdurige behandeling noodzakelijk is om de bacteriën volledig uit te schakelen. Deze langdurige behandelingen met een cocktail van antibiotica worden niet altijd volledig afgerond door patiënten, met een sterke toename in het aantal antibioticumresistente Mtb-stammen als gevolg. Medicatie gericht op de gastheer, bijvoorbeeld om de immunreactie te versterken, kan mogelijk oplossingen bieden voor de beperkingen van de huidige therapieën met antibiotica. Echter, de ontwikkeling van zulke gastheergerichte therapieën vereist een verregaand begrip van de interacties tussen de gastheer en de ziekteverwekker. Door meer inzicht in die interacties te verkrijgen hopen wij aanknopingspunten te vinden voor de ontdekking van medicijnen die aangrijpen op gastheerprocessen die belangrijk zijn voor de afweer tegen tbc. De zebravis is een veelgebruikt onderzoeksmodel voor tbc en is uitermate geschikt voor onderzoek naar interacties tussen gastheer en ziekteverwekker. Zebravisembryo's en -larven kunnen geïnfecteerd worden met *Mycobacterium marinum* (Mm), een bacterie die nauw verwant is aan Mtb en die een infectie met tbc-gerelateerde symptomen veroorzaakt in vissen. Met behulp van zebravisembryo's en -larven is het mogelijk om interacties tussen immuuncellen en Mm-bacteriën te bestuderen tijdens de vroegste stadia van de ontwikkeling van de karakteristieke tbc-granulomen.

Mycobacteriële ziekteverwekkers kunnen overleven en zich vermeerderen in cellen van het immuunsysteem, de macrofagen. Als reactie hierop initiëren macrofagen diverse afweermechanismen in een poging om de intracellulaire bacteriën op te ruimen en verdere verspreiding van de infectie te voorkomen. Er zijn veel factoren – zowel aan de gastheerkant als aan de bacteriële kant – die samen het lot van een geïnfecteerde macrofaag bepalen: ruimt de

macrofaag de bacteriën op, of gaat de cel ten onder aan de infectie? DRAM1, een regulator van autofagie en celdood, is in tijdens eerder onderzoek in verband gebracht met anti-mycobacteriële afweermechanismen die gebruik maken van de autofagiemachinerie. In dit proefschrift hebben we een mutatie in het *dram1*-gen van de zebravis geïntroduceerd met behulp van de CRISPR/Cas9-methode. In deze mutant zagen wij geen verlaging van de activiteit van autofagie in de afwezigheid van infectie. Echter, tijdens Mm-infectie zorgt mutatie van *dram1* voor een verminderde co-lokalisatie tussen bacteriën en autofagiestructuren en voor een verminderde afweer tegen mycobacteriële infecties. Bovendien hebben we aangetoond dat Dram1, een voornamelijk lysosomaal eiwit, noodzakelijk is voor de verzuring van de organellen waarin Mm verblijft. Door middel van intravitale microscopie konden we observeren dat macrofagen zonder Dram1 niet in staat zijn om een mycobacteriële infectie te beteugelen tijdens de vroege stadia van tbc. Uitschakelen van de functionele zebravishomoloog van Caspase 1 zorgde ervoor dat infectieniveaus in *dram1*-mutanten verlaagd werden. Voortbordurend op de eerder beschreven rol van Dram1 bij verzuring van Mm-bevattende organellen, wijzen deze nieuwe resultaten erop dat de aanwezigheid van Dram1 pyroptotische celdood van geïnfecteerde macrofagen voorkomt en op die manier bijdraagt aan de weerstand van de gastheer tegen een mycobacteriële infectie.

Om de functie van Dram1 nader te onderzoeken hebben we door middel van sequentieanalyse van het RNA de volledige genexpressiepatronen in kaart gebracht van ongeïnfecteerde en Mm-geïnfecteerde zebravislarven van de *dram1*-mutant en van wild-type zebravislarven als controlegroep. Deze zogenoemde transcriptoomanalyse liet zien dat in de gezonde situatie het netwerk van genexpressie slechts in geringe mate werd beïnvloed door afwezigheid van Dram1, met detecteerbare verschillen in proteolytische en metabole processen. De transcriptoomreactie op mycobacteriële infectie was echter sterk afwijkend in *dram1*-mutanten, wat suggereert dat de afweerreactie van de gastheer veranderd is in afwezigheid van Dram1. Bovendien vonden we dat de metabole reactie op mycobacteriële infectie die plaatsvindt in wild-type larven afwezig was in *dram1*-mutanten, wat nogmaals wijst op een rol voor Dram1 in metabole processen. Tenslotte is het noemenswaardig dat het verlies van Dram1 celdoodprocessen en herkenning van bacteriën via zogenaamde Toll-receptoren beïnvloedde.

Onze analyse suggereert dat Dram1 betrokken is bij de regulatie van celdoodprocessen die geactiveerd worden tijdens een mycobacteriële infectie, terwijl de herkenning van Mm op een andere manier plaats lijkt te vinden in afwezigheid van Dram1. Samenvattend onthult onze transcriptoomanalyse een rol voor Dram1 in metabole processen onder zowel gezonde omstandigheden als tijdens de cellulaire stress die veroorzaakt wordt door infectie. Bovendien benadrukt onze analyse het belang van autofagiemechanismen in de verdediging van de gastheer tegen mycobacteriële infecties.

In vitro studies hebben aangetoond dat mycobacteriën die ontsnappen vanuit fagosomen naar het cytosol gemarkeerd worden met een afbraaksignaal, ubiquitine, en vervolgens herkend worden door selectieve autofagiereceptoren. Daarentegen is er tot op heden geen *in vivo* bewijs voor een rol van selectieve autofagiereceptoren in de verdediging van de gastheer tegen mycobacteriële infecties en het belang van dit proces is controversieel. In dit proefschrift hebben we het zebrawismodel voor tbc gebruikt om de rol van twee selectieve autofagiereceptoren, Optineurin (*optn*) en SQSTM1 (*p62*), in de verdediging van de gastheer tegen mycobacteriële ziekteverwekkers. Hiertoe zijn mutanten van *optn* en *p62* gegenereerd met de CRISPR/Cas9-methode in een transgene GFP-Lc3-zebravislijn die gebruikt kan worden om de autofagiereactie tegen Mm te visualiseren. We vonden dat mutaties in *optn* of *p62* resulteerde in een verminderde autofagiereactie tegen Mm en een verhoogde vatbaarheid voor Mm-infectie. We konden deze resultaten reproduceren door de genen tijdelijk uit te schakelen. Bovendien resulteerde verhoogde genexpressie van *optn* of *p62* door middel van mRNA-injectie in een verhoogde associatie tussen GFP-Lc3 en Mm en een verlaagde infectiegraad. Samenvattend kunnen we op grond van de resultaten van deze *in vivo* studie naar de rol van selectieve autofagiereceptoren concluderen dat zowel Optineurin als p62 noodzakelijk zijn voor autofagie-gerelateerde verdedigingsmechanismen tegen mycobacteriële infecties in de zebravis.

De zebravis *dram1*-mutanten beschreven en gekarakteriseerd in **hoofdstuk 2** van dit proefschrift laten zien dat afwezigheid van Dram1 resulteert in ongecontroleerde Mm-infecties door gebrekkige maturatie van organellen die Mm bevatten, verminderde verdedigingsmechanismen gebaseerd op autofagie en een verhoging van het aantal cellen dat pyroptotische celdood ondergaat. In **hoofdstuk 3** hebben we laten zien dat de afwezigheid van

Dram1 invloed heeft op genexpressienetwerken in zowel ongeïnfekteerde als Mm-geïnfekteerde zebraïslarven, met name metabole processen, lytische celdood en signaalroutes van Toll-receptoren. Tenslotte hebben we in **hoofdstuk 4** van dit proefschrift laten zien dat de selectieve autofagiereceptoren Optineurin en p62 een belangrijke rol spelen in de immuunverdediging van de gastheer tijdens mycobacteriële infecties door geubiquitineerde bacteriën te herkennen en aan te vallen door middel van autofagie. Samenvattend levert dit proefschrift nieuw bewijs voor de belangrijke rol van selectieve autofagie in het verhinderen van mycobacteriële proliferatie binnen macrofagen van de gastheer. Bovendien levert dit proefschrift verdere ondersteuning voor de notie dat het stimuleren van de aangeboren immuunprocessen die gebaseerd zijn op de functies van Dram1, p62 en Optineurin, een waardevolle strategie is om nieuwe behandelmethoden voor tbc te ontwikkelen.